

989年)に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

[0078] (実施例)

以下の実施例中、COS7細胞とはアフリカミドリザル腎臓由来の細胞でATCC(アメリカンタイプカルチャーコレクション)より入手可能な細胞(No. CRL-1651)であり、293T細胞とはヒト胎児腎臓由来の細胞でGeneHunter Co.より入手可能な細胞(Cat.No.Q401)であり、MRC-5細胞とはヒト胎児正常繊維芽細胞由来の細胞で理研バイオリソースセンターより入手可能な細胞(No.RCD0211)であり、B16F10細胞はマウス黒色細胞腫由来の細胞でATCCより入手可能な細胞(No.CRL-6475)であり、Lewis Lung carcinomas(LLC)細胞はマウス肺癌由来細胞でATCCより入手可能な細胞(No.CRL-1642)である。また、実施例中、HUVECs細胞(ヒト臍帯静脈内皮細胞)及びHMVECs(ヒト皮膚微静脈内皮細胞)は、Clontics社より、またNHDFs細胞は三光純薬より、それぞれ入手可能である。

実施例 1

[0079] 可溶性ポリペプチドタンパク質の検出

＜方法＞ ヒトChM1L(アミノ酸1-317)のC末端にFLAGタグが融合したタンパク質をコードするcDNA(配列番号1)をPCR法により増幅し、pCAGGSベクター(Miwa等、*Gene* (Netherlands) 1991年12月15日発行 108巻2号 p193-200)にクローニングした(pCAGGS-hChM1L-FLAG)。尚、本実施例で述べるFLAGタグ(Sigma社)とは、8アミノ酸からなる親水性のマーカールペプチド(Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys)である。リポフェクトアミンプラス試薬(Life technologies社)を用いて、製品説明書に従い、pCAGGS及びpCAGGS-hChM1L-FLAGをCOS7細胞及び293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトしてから約48時間後に培養上清を回収し、抗FLAG M2アガロース(Sigma社)で免疫沈降を行った。免疫沈降後のサンプルを15%ゲルでSDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)を行い、ニトロセルロース膜にトランスファーした。一次抗体は抗ChM1Lポリクローナル抗体(非特許文献5)、二次抗体はホースラディッシュペーパーオキシダーゼ(horseradish peroxidase)で標識された抗ウサギIgG抗体(Dako社)を用い、ECLplus試薬(

→

作により実施した。total RNAはC57/BL6マウスの各組織からISOGEN(ニッポンジーン製)を用いて抽出後、RNeasy Mini Kit(キアゲン製)およびRNase-Free DNase Set(キアゲン製)によりクリーンアップした。cDNAの合成は、Omniscript RT Kit(キアゲン製)、RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor(インビトロジェン製)、およびRandom Primer(タカラバイオ製)を用いた逆転写反応により行った。Real-time PCRは、mouse ChM1L遺伝子に対するセンスプライマー、アンチセンスプライマー、SYBR Green PCR Master Mix、cDNAを含む反応液を用いて行った。プライマーは、mouse ChM1L mRNAの測定用として(センスプライマー)5'-AAACACTTCTGGCCCGAGGTAT-3'、(アンチセンスプライマー)5'-AGTGTGCTCCATGTCATAGGTTTTC -3'を用いた。また、mouse GAPDH mRNAの測定用のセンスプライマー、アンチセンスプライマーはアプライド バイオシステムズ株式会社から購入したものをを用いた。PCR反応は、1)変性(95℃で15秒間)、2)アニーリングおよび伸長反応(60℃で1分間)の条件で40サイクルまで行った。各標的遺伝子の発現量の定量化は、GeneAmp 5700 Sequence Detection Systemソフトウェア(アプライド バイオシステムズ株式会社)を用いて行った。すなわち、増幅されたPCR産物に結合したSYBR Greenの蛍光シグナル強度をPCRサイクル毎に経時的に測定し、サイクル数に対するPCR産物の増幅曲線を作成後、この増幅曲線と任意の閾値(増幅曲線の指数増幅領域の midpoint 付近を選択)の交わるThreshold cycle(Ct)値を算出することにより行った。内部標準であるGAPDHに対するChM1L mRNAの相対的な発現量は、以下に示す計算式によりそれぞれ算出した。

$$[0121] \quad \text{ChM1L mRNAの相対的な発現量} = 2^{-(\text{GAPDHのCt} - \text{ChM1LのCt})}$$

<結果> ChM1L mRNAの発現はアキレス腱において最も高かった(図19)。目、脳、肺、胸腺、横隔膜、胃、脾臓、筋肉、皮膚、肋骨においてもChM1L mRNAの発現が見られたが、アキレス腱と比べるとはるかに低かった。また、脾臓、心臓、肝臓、腎臓、小腸、脂肪組織においてChM1L mRNAの発現は検出されなかった。これらのことから、ChM1Lは腱特異的に発現していることが示唆された。

実施例 19

[0122] マウス腱細胞の単離およびChM1L mRNA発現の細胞特異性解析

＜方法＞ マウスの腱細胞は以下に示す操作により単離した。すなわち、マウスのアキレス腱を皮膚、筋肉、脂肪が混入しないように摘出し、2 mg/mLのコラゲナーゼを含むDMEM/10% FBS中で3時間消化した(37℃、5% CO₂)。遠心後、得られた細胞ペレットをDMEM/10% FBSに懸濁し、10 cmシャーレ内で培養した(37℃、5% CO₂)。7日後、培養細胞の十分な増殖が観察されたため、継代培養を行い、これをマウス腱細胞とした。

- [0123] ChM1L mRNA発現の細胞特異性については、マウス腱細胞およびマウス由来の細胞株からtotal RNAを抽出後、real-time PCRを行うことによって解析した。すなわち、以下に示す操作により実施した。total RNAはRNeasy Mini Kit (キアゲン製) および RNase-Free DNase Set (キアゲン製) により抽出した。cDNAの合成は、Omniscript RT Kit (キアゲン製)、RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (インビトロジェン製)、およびRandom Primer (タカラバイオ製)を用いた逆転写反応により行った。Real-time PCRは、mouse ChM1L遺伝子に対するセンスプライマー、アンチセンスプライマー、SYBR Green PCR Master Mix、cDNAを含む反応液を用いて行った。プライマーは、mouse ChM1L mRNAの測定用として(センスプライマー)5'-AAACACTTCTGGCCCGAGGTAT-3'、(アンチセンスプライマー)5'-AGTGTGCTCCATGTCATAGGTTTTC -3'を用いた。また、mouse GAPDH mRNAの測定用のセンスプライマー、アンチセンスプライマーはアブライド バイオシステムズ株式会社から購入したものを用いた。PCR反応は、1)変性(95℃で15秒間)、2)アニーリングおよび伸長反応(60℃で1分間)の条件で40サイクルまで行った。各標的遺伝子の発現量の定量化は、GeneAmp 5700 Sequence Detection Systemソフトウェアを用いて行った。すなわち、増幅されたPCR産物に結合したSYBR Greenの蛍光シグナル強度をPCRサイクル毎に経時的に測定し、サイクル数に対するPCR産物の増幅曲線を作成後、この増幅曲線と任意の閾値(増幅曲線の指数増幅領域の midpoint 付近を選択)の交わるThreshold cycle (Ct) 値を算出することにより行った。内部標準であるGAPDHに対するChM1L mRNAの相対的な発現量は、以下に示す計算式によりそれぞれ算出した。

[0124] ChM1L mRNAの相対的な発現量 = $2^{-(\text{GAPDHのCt} - \text{ChM1LのCt})}$

vehicle (25mM HEPES, 0.15M NaCl, pH8.3) を50 μ L/siteで癌細胞周辺の皮下に投与した。癌細胞の大きさを毎日 caliper で測定した (Length \times width² \times 0.52)。in vitro での LLC 細胞の増殖解析は DNA 合成 (細胞内への BrdU の取り込み) を指標にして行った。細胞を 96 穴プレートに 3,000 個/well の濃度で培養し、その後、血清非存在下で 24 時間インキュベートした (37°C、CO₂ 存在下)。各ウェルを洗浄後、様々な濃度の MS-ChM1L の存在下、10% FBS で 24 時間細胞を刺激した。BrdU は培養の最後の 3 時間、細胞に取り込ませた。

- [0129] <結果> MS-ChM1L は in vivo で LLC 細胞の増殖を抑制した (図 22A)。一方、in vitro では LLC 細胞の増殖を抑制しなかった (図 22B)。これらのことから、MS-ChM1L は血管新生阻害作用により、in vivo における LLC 細胞の増殖を抑制したと考えられた。

実施例 22

- [0130] カスパーゼを介した血管内皮細胞のアポトーシス誘導作用の解析

<方法> カスパーゼはシステイン残基を活性中心に持つシステインプロテアーゼで、アポトーシスではキーとなるメディエーターであることが知られている。カスパーゼを介したアポトーシス誘導作用の解析は CaspACE FITC-VAD-FMK In Situ Marker (Promega 製) を用いて実施した。CaspACE FITC-VAD-FMK In Situ Marker は細胞透過性の FITC 標識カスパーゼ阻害剤 VAD-FMK (FITC-VAD-FMK) で、細胞の内外を自由に移動でき、活性化カスパーゼに不可逆的に結合することにより、アポトーシス細胞にのみ留まることが知られている。したがって、カスパーゼを介してアポトーシスを起こしている細胞は、フローサイトメーターによる解析で FITC の蛍光強度が強く観察される。6 穴プレートに HUVECs を 155,000 個/well の濃度で、MRC-5 cells (理化学研究所バイオリソースセンター No. RCD02111) を 100,000 個/well の濃度でそれぞれ培養し、その後、血清非存在下で 24 時間インキュベートした (37°C、CO₂ 存在下)。各ウェルを洗浄後、25 μ g/mL の MS-ChM1L の存在下、10 ng/mL FGF-2 で細胞を刺激した。48 時間後、10 μ M となるように FITC-VAD-FMK を添加し、30 時間インキュベートした (37°C、CO₂ 存在下)。細胞をトリプシン-EDTA で剥離し、フローサイトメーターにより解析した。

u